

明 細 書

悪性腫瘍の検査方法

技術分野

- [0001] 本発明は悪性腫瘍の検査方法に関するものであり、細胞増殖因子受容体の受容体機能をヒト化モノクローナル抗体によって阻害しようとする治療法の治療方針、予後予測、および治療効果予測のための検査方法に関するものである。

背景技術

- [0002] 癌の分子標的治療剤は、新しいタイプの制癌剤として従来の細胞標的治療剤と対比してその意義が注目されている。その中でも特にシグナル伝達阻害作用を有する薬剤が注目されている。
- [0003] c-erbB-2癌遺伝子は、細胞膜を貫通する受容体構造をもつ分子量185kDaの蛋白質(HER2/c-erbB-2)をコードしている(非特許文献1、2)。HER2/c-erbB-2はチロシンキナーゼ型受容体であり、ヒト上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)遺伝子と類似の構造を有するEGFRファミリーに属する。HER2/c-erbB-2の細胞外ドメインはレセプター構造になっており、細胞外リガンドがこの細胞外ドメインと結合し、細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼが活性化する。このことによりHER2/c-erbB-2の自己リン酸化およびHER2/c-erbB-2と細胞内で相互作用する物質のリン酸化が引き起こされ、細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、細胞の増殖・分化に関与していると考えられている(非特許文献3)。HER2/c-erbB-2蛋白質は種々のヒトの腫瘍で過剰発現している。特に乳癌においては、c-erbB-2遺伝子またはその蛋白質の過剰発現のある患者は予後不良であり、診断、予後あるいは治療方針を決める上でc-erbB-2遺伝子は重要な因子の1つである。
- [0004] トラスツズマブ(ハーセプチン^{登録商標})はHER2/c-erbB-2蛋白質に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。トラスツズマブ(ハーセプチン^{登録商標})はHER2/c-erbB-2蛋白質を過剰発現している腫瘍細胞を標的として特異的に結合する。このことによりHER2/c-erbB-2蛋白質の受容体機能を阻害し、シグナル伝達を阻害することにより腫瘍細胞の増殖を阻害する。したがって、トラスツズマブ(ハーセプ

の細胞RNA又は細胞DNAに結合させ、その後蛍光顕微鏡下で、その遺伝子を蛍光シグナルとして検出する方法である。

- [0011] 免疫組織化学法とFISH法について、HER2/c-erbB-2の発現の検査における有効性の比較が行われた。その結果、FISH法の方が免疫組織化学法より再現性に優れており、HER2/c-erbB-2の発現の状態をより正確に判断できる、という結論が出てい。さらに、FISH法で陽性の場合におけるトラスツマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療の有効例の比率は、免疫組織化学法で陽性の場合より多いとされている。しかし、FISH法は手数およびコストがかかることから、免疫組織化学法で2+の場合にのみFISH法を実施して、トラスツマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療の有用性を決めるのが良い、という結論が出されている（非特許文献5）。

- [0012] ムチン4（MUC4）は細胞膜内HER2/c-erbB-2結合体である（非特許論文6）。さらに、HER2/c-erbB-2を発現し、MUC4/シアロムチンのない細胞にMUC4/シアロムチンをトランスフェクトするとHER2/c-erbB-2の1248番目のチロシンがリン酸化されることから、MUC4/シアロムチンはHER2/c-erbB-2のリン酸化にも関係している（非特許論文6）。

非特許文献1: Biochem. et Biophys. Acta, 1198, 165-184 (1994)

非特許文献2: Oncogene, 9, 2109-2123 (1994)

非特許文献3: Brit. J. Cancer, 72, 1259-1266 (1995)

非特許文献4: Science, 235, 177-182 (1987)

非特許文献5: J. Pathology, 199, 411-417 (2003)

非特許文献6: J. Biol. Chem., 278, 30142-30147 (2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明が解決しようとする課題は、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有効性を正確に判定するための新たな検査方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0014] 上記課題を解決するため、本発明者は腫瘍関連因子の受容体であるHER2/c-erbB-2を標的とする制癌剤であるトラスツマブ（ハーセプチン^{登録商標}）の有

[0019] つまり、本発明は以下からなる；

1. 腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し行われる検査方法であって、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査に加えて、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することを特徴とする制癌剤治療の有用性判定のための検査方法。
2. 前記腫瘍関連因子の受容体が細胞増殖因子受容体である前項1に記載の検査方法。
3. 前記細胞増殖因子受容体が上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体である前項2に記載の検査方法。
4. 前記上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体がHER2/c-erbB-2である前項3に記載の検査方法。
5. 前記細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質が糖蛋白質である前項1から4のいずれかーに記載の検査方法。
6. 前記糖蛋白質がムチン類である前項5に記載の検査方法。
7. 前記ムチン類がムチン4(MUC4)である前項6に記載の検査方法。
8. 前記制癌剤が当該受容体に対する抗体である前項1から7のいずれかーに記載の検査方法。
9. 前記抗体がヒトモノクローナル抗体である前項8に記載の検査方法。
10. 前記ヒトモノクローナル抗体がトラスツズマブ(ハーセプチン^{登録商標})である前項9に記載の検査方法。
11. 前項1から10のいずれかーに記載の検査方法に使用する試薬。
12. 前項1から10のいずれかーに記載の検査方法に使用する試薬キット。

発明の効果

[0020] 本発明により、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有用性判定の予測がより確実に可能となる。さらに、このことにより的確な治療方針の立案が可能となり、治療効果が期待できない癌に対する過剰な投薬を抑制できる等、医療経済に対しても効果が期待できる。

一部は癌抗原として知られている。ムチン類の中でも、MUC4は細胞内で HER2/c-erbB-2蛋白質と相互作用することが知られており、好適な例として挙げられる。

[0026] 制癌剤とは、悪性腫瘍に対して用いられる薬物の総称であり、癌遺伝子の発現及び/又は発現産物の機能を抑制する。本発明の制癌剤は、腫瘍関連因子の受容体を標的とする。この各定義は上述した。このような制癌剤としては、癌の分子標的治療剤が例示される。特にシグナル伝達作用を阻害する薬剤が代表的であり、いわゆるチロシンキナーゼ阻害剤等が例示される。そのようなものには例えば、微生物由来のアーブスタチン(Erbstatin)、ラベンダスチン(Lavendustin)、ハービマイシンA(Herbimycin A)、ゲニスタイン(Genistein)等、化学合成品では、ベンジリデンマロンニトリル誘導体(特開平2-138238号公報、Journal of Medical Chemistry, 32, 2344 (1989); 同34,1896(1991))、 α -シアノケイ皮酸アミド誘導体(特開昭63-222153号公報)、3, 5-ジイソプロピル-4-ヒドロキシステレン誘導体(特開昭62-39522号公報)、3, 5-ジブチル-4-ヒドロキシステレン誘導体(特開昭62-39523号公報)、アーブスタチン類縁化合物(特開昭62-277347号公報)等がある。

[0027] 制癌剤としては、シグナル伝達系に関与する産物に対する抗体が好ましく、ヒトモノクローナル抗体がより好ましい。シグナル伝達系に関与する産物としては各受容体があり、各受容体に対する抗体が例示される。代表的な受容体としては、HER2/c-erbB-2が例示される。さらに、HER2/c-erbB-2に対するヒトモノクローナル抗体であるトラスツマブ(ハーセプチン^{登録商標})が好適に例示される。この他、本発明の対象となる制癌剤の分子標的治療剤としては、ZD1839(イレッサ^{登録商標})、STI-571等が例示される。ZD1839(イレッサ^{登録商標})はEGFRのチロシンキナーゼ活性の阻害剤であり、STI-571はBCR-Abl及びc-kitのチロシンキナーゼ活性の阻害剤である。

[0028] ガン(癌)とは、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態をいう。ガンの例には、これらに限定されるものではないが、ガン腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、黒色腫及び白血病が含まれる。このようなガンのより特定の例には、扁平細胞ガン、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺ガン、肺の扁平

来からの方法によりパラフィンで包埋及び加工されうる。組織試料が包埋されると、試料はミクローム等により切片化されうる。切片化されると、切片は幾つかの標準的な方法でスライドに貼り付けられうる。

[0032] パラフィンが包埋の材料として使用された場合、組織切片は一般に脱パラフィンし、水で再水和する。組織切片は幾つかの従来からの標準的な方法で脱パラフィンをすることができる。例えば、キシレン及び緩やかな下降系列アルコールを使用することができる。

[0033] 遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査方法として、遺伝子検査法と免疫学的検査法が挙げられる。さらに、本発明には、遺伝子検査法と免疫学的検査法の併用、さらに他の検査方法との併用も含まれる。

[0034] 遺伝子検査法とは、遺伝子増幅を検査する方法であり、FISH法、RT-PCR法、サザンブロットリング等の従来からの方法が用いられる。ここで、遺伝子増幅とは、染色補体の腫瘍抗原コーディング遺伝子の一以上の付加的な遺伝子複製物の存在を意図している。遺伝子増幅は蛋白質の過剰発現を生じうる。遺伝子検査法に用いるプローブは、RNA又はDNAのオリゴヌクレオチドでもポリヌクレオチドでもよい。プローブは、安定した特異的な結合が標的核酸プローブとの間に生じるように、対象とする標的核酸配列と十分な相補性を有しうる。安定したハイブリダイゼーションに必要な相同性の程度は、ハイブリダイゼーション媒体及び／又は洗浄媒体の厳密性により変化する。プローブの選択は標的遺伝子の性質に依存する。

[0035] 免疫学的検査法とは、遺伝子の発現産物を抗体により検査する方法であり、免疫組織化学法、EIA法等の従来からの方法が用いられる。免疫学的検査法に使用する抗体類には、これに限定されないが、モノクローナル抗体類、ポリクローナル抗体類及びその断片が含まれる。

[0036] 以下の方法は、HER2/c-erbB-2を特異的に認識する抗体を利用する免疫組織化学染色法の一例である；

通常の方法に従い調製されたパラフィン包埋された組織の切片を、キシレン溶液及び下降系列アルコール溶液により脱パラフィンし、蒸留水で洗浄する。次に、内在性のペルオキシダーゼ活性を除去する為に、室温で30分間0.3% 過酸化水素を含むメ

[0040] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するものではない。

[0041] 実施例1

乳癌患者の組織について、上述の免疫組織化学的染色によりHER2/c-erbB-2を検出した症例について、トラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療効果と免疫組織化学法によるMUC4の染色性の関係について調べた。

その結果、表1に示すような結果が得られた。HER2/c-erbB-2が（++）以上である6例うち、MUC4陽性は3例中1例が（+++）、2例中2例が（++）であった。この結果から、HER2/c-erbB-2とMUC4の発現は相関しないことが明らかになった。従って、HER2/c-erbB-2とMUC4のそれぞれを検査する意義があることが示された。

HER2/c-erbB-2陽性（+++）の3例のうち完全寛解した1例はMUC4陽性で、効果なしであった1例はMUC4陰性であり余り効果がなく、トラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療の拒絶が1例であった。HER2/c-erbB-2陽性（++）である2例はいずれもMUC4陽性であり、うち1例はStageが早いいためトラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療をしていないが、トラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療例は完全寛解であった。

以上より、MUC4の発現とHER2/c-erbB-2の発現は必ずしも平行関係になく、MUC4陽性かつHER2/c-erbB-2陽性（++）以上の症例はトラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）に対する反応性が良いが、MUC4陰性の場合にはHER2/c-erbB-2陽性でもトラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療が効果的でないことが判った。したがって、HER2/c-erbB-2とMUC4を組み合わせることで検査することによりトラスツズマブ（ハーセプチン^{登録商標}）による治療効果を予測できることが判った。

[0042] [表1]

請求の範囲

- [1] 腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し行われる検査方法であって、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査に加えて、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することを特徴とする制癌剤治療の有用性判定のための検査方法。
- [2] 前記腫瘍関連因子の受容体が細胞増殖因子受容体である請求項1に記載の検査方法。
- [3] 前記細胞増殖因子受容体が上皮細胞増殖因子受容体又は上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体である請求項2に記載の検査方法。
- [4] 前記上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体がHER2/c-erbB-2である請求項3に記載の検査方法。
- [5] 前記細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質が糖蛋白質である請求項1から4のいずれかに記載の検査方法。
- [6] 前記糖蛋白質がムチン類である請求項5に記載の検査方法。
- [7] 前記ムチン類がムチン4(MUC4)である請求項6に記載の検査方法。
- [8] 前記制癌剤が当該受容体に対する抗体である請求項1から7のいずれかに記載の検査方法。
- [9] 前記抗体がヒトモノクローナル抗体である請求項8に記載の検査方法。
- [10] 前記ヒトモノクローナル抗体がトラスツマブ(ハーセプチン^{登録商標})である請求項9に記載の検査方法。
- [11] 請求項1から10のいずれかに記載の検査方法に使用する試薬。
- [12] 請求項1から10のいずれかに記載の検査方法に使用する試薬キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ G01N33/15, 33/53, 33/574, 33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ G01N33/15, 33/53, 33/574, 33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), Caplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shari A. PRICE-SCHIAVI, RAT MUC4 REDUCES BINDING OF ANTI-EREB2 ANTIBODIES TO TUMOR CELL SURFACES, A POTENTIAL MECHANISM FOR HERCEPTIN RESISTANCE, International Journal of Cancer, Vol. 99, 2002, pages 783 to 791, see Abstract	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June, 2005 (14.06.05)

Date of mailing of the international search report

28 June, 2005 (28.06.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/15, 33/53, 33/574, 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/15, 33/53, 33/574, 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN)、CAplus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Shari A. PRICE-SCHIAVI, RAT MUC4 REDUCES BINDING OF ANTI-ERBB2 ANTIBODIES TO TUMOR CELL SURFACES, A POTENTIAL MECHANISM FOR HERCEPTIN RESISTANCE, International Journal of Cancer, Vol.99, 2002, p783-791, see Abstract	1-12

「C欄の続きにも文献が列挙されている。」

「B欄の続きにも文献が列挙されている。」

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.06.2005

国際調査報告の発送日

28.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

21

9408

加々美 一恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3252